

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003440

International filing date: 23 February 2005 (23.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-47605  
Filing date: 24 February 2004 (24.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

23.02.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 2 月 2 4 日

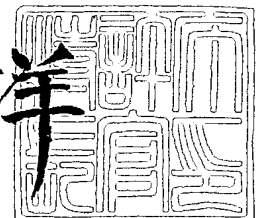
出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 4 7 6 0 5  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 4 - 0 4 7 6 0 5 ]

出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構

2 0 0 5 年 3 月 3 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



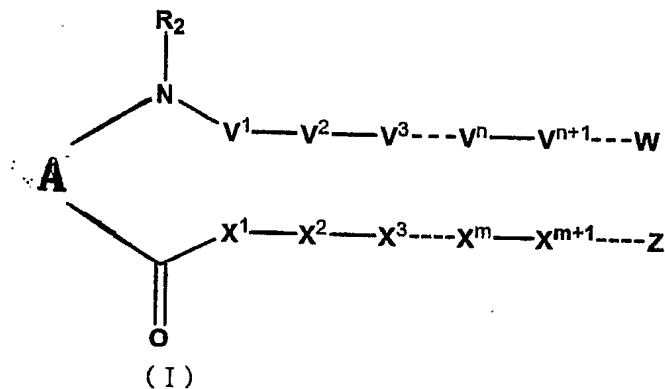
【書類名】 特許願  
【整理番号】 AB04003J  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1 - 2 6 - 4 6  
    【氏名】 関根 光雄  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区しらとり台 4 8 - 5 第 2 パークサイド内  
    田 1 0 2  
    【氏名】 清尾 康志  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市緑区長津田町 4 3 1 2 - 1 セントラルハウス 2  
    0 5 号  
    【氏名】 水田 昌宏  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市緑区長津田 3 - 2 3 - 1 8 越路荘 2 0 3 号  
    【氏名】 寺田 武史  
【特許出願人】  
    【識別番号】 503360115  
    【氏名又は名称】 独立行政法人 科学技術振興機構  
【代理人】  
    【識別番号】 100100181  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 阿部 正博  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 053419  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0316565

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

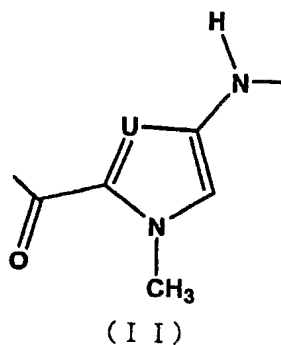
一般式 (I) で表されるフェロセン化合物:

【化 1】



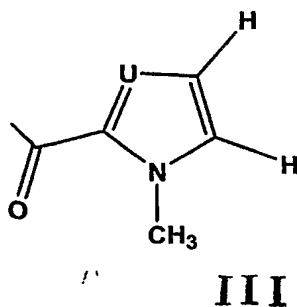
(一般式 (I) 中、A は二価のフェロセン含有リンカー又はフェロセン-1,1'-イールであり、R<sub>2</sub> は水素原子又はアルキルを示し、n 及び m は任意の自然数を示し、V 及び X は以下の一般式 (II) であり:

【化 2】



W は一般式 (III) であり:

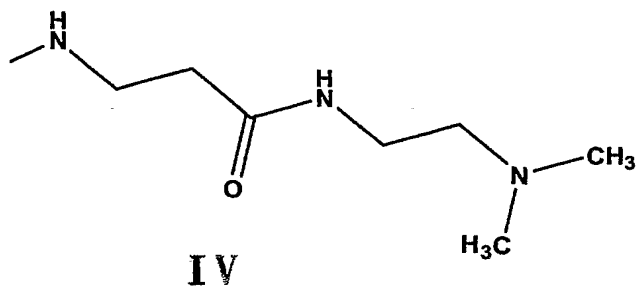
【化 3】



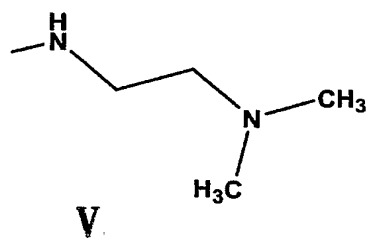
(一般式 (II) 及び一般式 (III) 中、U は窒素原子、メチン、又はヒドロキシメチンを示す); 及び

Z は一般式 (IV) 又は (V) であり:

## 【化 4】



## 【化 5】



且つ、一般式 (I) において、V 1 のフェロセン含有リンカー又はフェロセン-1,1' -イル側の結合は  $(-CO-NR_2-)$  であり、それ以外の各 V n 及び X m の両端は  $(-CO-NH-)$  結合を形成する)。

## 【請求項 2】

n 及び m が、3 ～ 20 の範囲の自然数であることを特徴とする、請求項 1 記載のフェロセン化合物。

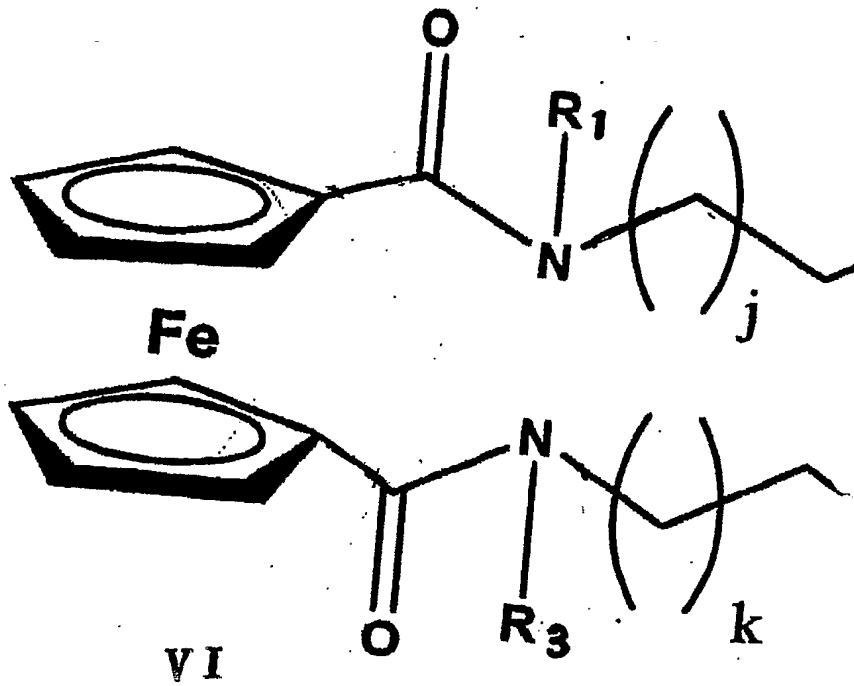
## 【請求項 3】

n は m より一つ少ない数である、請求項 1 又は 2 に記載のフェロセン化合物。

## 【請求項 4】

フェロセン含有リンカーが以下の一般式 (VI) で表される請求項 1 記載のフェロセン化合物：

【化6】

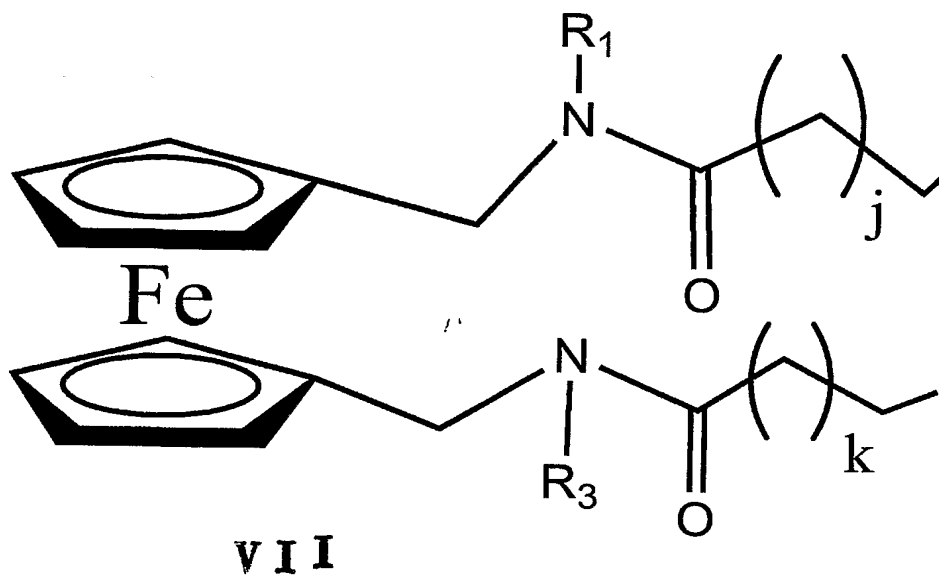


(式中、R<sub>1</sub> 及び R<sub>3</sub> は水素原子又はアルキルを示し、j 及び k は同一又は異なる 0 から 5 までの整数を示す)。

【請求項 5】

フェロセン含有リンカーが以下の一般式 (VII) で表される請求項 1 記載のフェロセン化合物:

【化 7】



(式中、 $R_1$  及び  $R_3$  は水素原子又はアルキルを示し、 $j$  及び  $k$  は同一又は異なる 0 から 5 までの整数を示す)。

【請求項 6】

$j$  及び  $k$  が 1 である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のフェロセン化合物。

【請求項 7】

$R_1$  及び  $R_3$  は水素原子である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のフェロセン化合物。

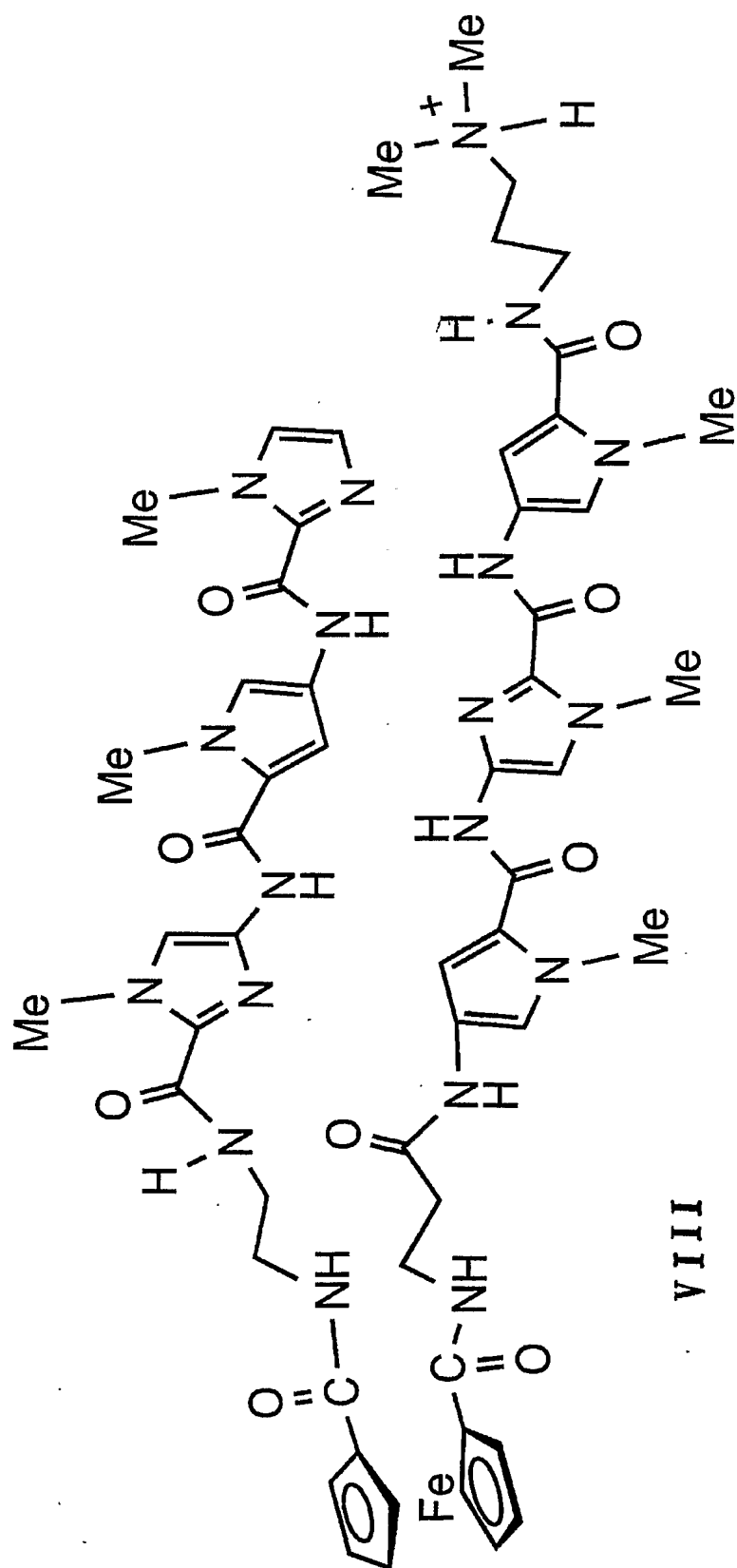
【請求項 8】

$R_1$ 、 $R_2$  及び  $R_3$  が 1 個ないし数個の炭素原子を有するアルキル基である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のフェロセン化合物。

【請求項 9】

下記構造式 (VIII) で表されるフェロセン化合物：

【化 8】

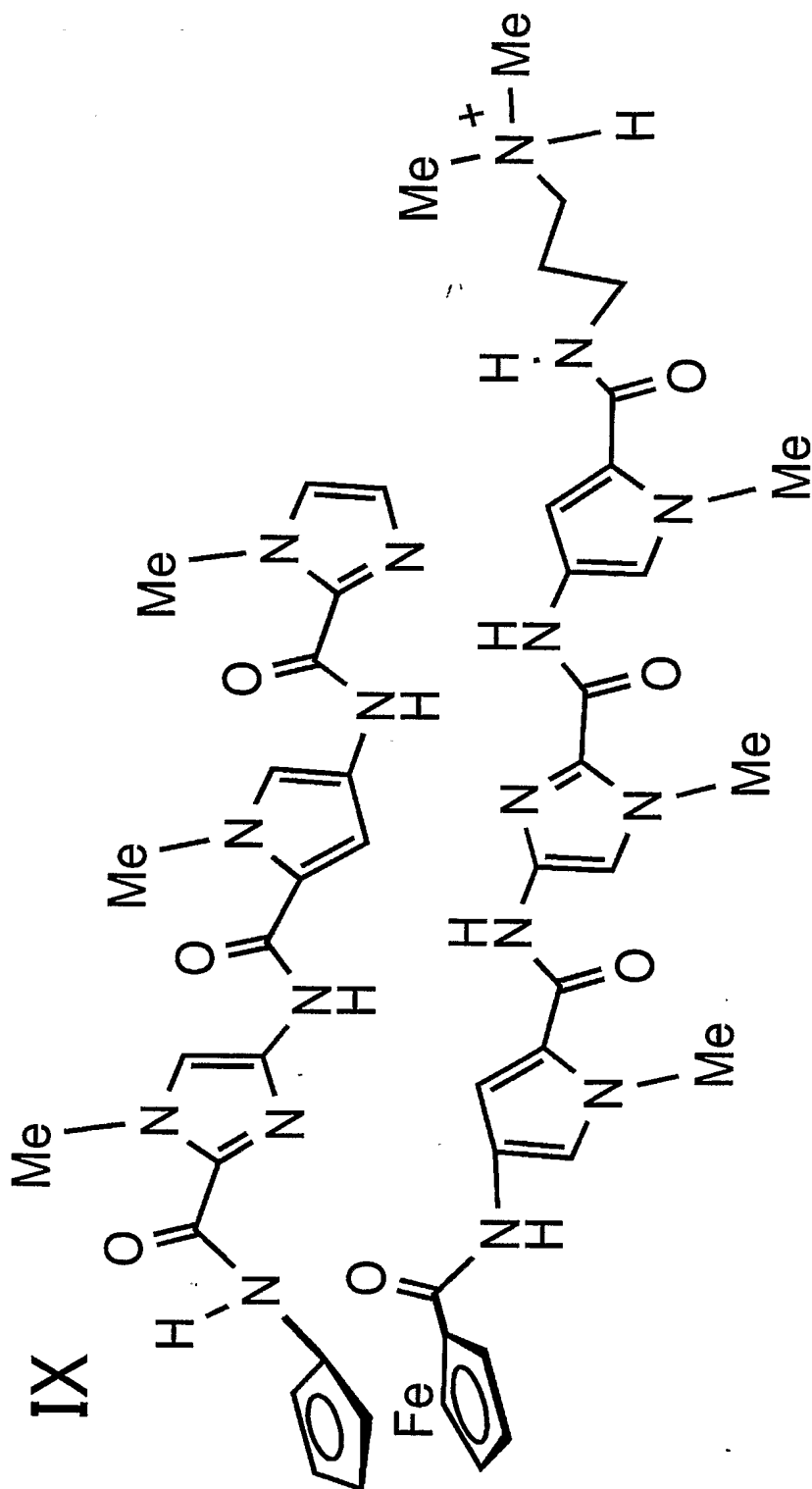




【請求項 1 0】

下記構造式 ( I X ) で表されるフェロセン化合物：

【化9】



【請求項 11】

フェロセンジカルボン酸メチルを出発物質とし、縮合反応を含む工程から成る、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のフェロセン化合物の製造方法。

【請求項 12】

化 10 及び化 11 に示された工程から成る、請求項 11 記載の製造方法。

【請求項 13】

アミノフェロセンカルボン酸メチルを出発物質とし、縮合反応を含む工程から成る、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のフェロセン化合物の製造方法。

【請求項 14】

化 12 に示された工程から成る、請求項 13 記載の製造方法。

【請求項 15】

請求項 1～10 のいずれか一項に記載のフェロセン化合物から成る二本鎖核酸分子の配列特異的検出用リガンド。

【請求項 16】

二本鎖核酸分子の配列特異的に結合することができる化合物を使用することを特徴とする二本鎖核酸分子の電気化学的検出方法。

【請求項 17】

請求項 15 記載のリガンドを使用することを特徴とする、請求項 16 記載の配列特異的な二本鎖核酸分子の電気化学的検出方法。

【請求項 18】

検出対象である二本鎖核酸分子における G/C 塩基対及び A/T (U) 対に対して、一般式 (I) 中の対応する位置にある V 及び X の対が、夫々、イミダゾール誘導体/ピロール誘導体及びピロール誘導体/誘導体で構成される請求項 15 記載のリガンドを使用することを特徴とする、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

二本鎖核酸分子の形成が固相上で行われることを特徴とする、請求項 16～18 のいずれか一項に記載の核酸分子の電気化学的検出方法。

【請求項 20】

DNA マイクロアレイを用いることを特徴とする、請求項 19 記載の核酸分子の電気化学的検出方法。

【請求項 21】

請求項 16～20 のいずれか一項に記載の核酸分子の電気化学的検出方法を用いる 1 塩基多型 (SNP) の検出方法。

【請求項 22】

請求項 15 記載の配列特異的二本鎖核酸分子検出用リガンドを含む電気化学的検出装置又は器具。

【請求項 23】

DNA マイクロアレイである、請求項 22 記載の電気化学的検出装置又は器具。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】電気化学的に活性な配列特異的二本鎖核酸分子検出用リガンド

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、配列特異的な二本鎖核酸分子検出用リガンドとして使用することが出来る、電気化学的に活性なフェロセン化合物等に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

DNAマイクロアレイ (DNAチップ) はスライドガラスやシリコン基盤上にDNA配列断片 (プローブ) を高密度に並べたものの総称であり、近年開発された遺伝子の発現解析に用いられる分析ツールである。調整したRNA又はDNA試料 (ターゲット) をハイブリダイズし、ハイブリダイズ形式の強度を指標にして、各遺伝子の転写量を測定するものである。又、このようなDNAマイクロアレイは、1塩基多型 (SNP) の検出にも使用されるようになってきている。

## 【0003】

市販されているDNAチップの代表的なものとして、米国Affimetrix社が販売している「アフィメトリックス型」と、米国スタンフォード大学が開発した「スタンフォード型」が知られている。アフィメトリックス型のチップは半導体加工技術を用いて、シリコン基板上にDNAプローブを高密度で合成していくものであり、1チップの上に数千~数万種類のプローブを固定することが出来る。スタンフォード型のチップは予め用意したDNA断片をスライドに滴下して作る。これらのチップにおいて検出はターゲットに結合させたほう蛍光色素を用いて画像解析により行うことが一般的である。

## 【0004】

更に、近年、蛍光色素に代わって、プローブとターゲットとのハイブリダイゼーションの結果を電気化学的に測定する技術 (electrochemical Array: ECAチップ) も開発されてきた (Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K. Natl. Biotechnol. 2003, 21, 1192-1199)。このようなハイブリダイゼーションの電気化学的な検出は、二本鎖DNAの隣接した塩基対間に挿入する性質を有する「インターカレート剤」と呼ばれる化合物の中でも導電性を有する化合物を用いて行われる。このような導電性インターカレート剤としては、例えば、アントラキノン、ナフトキノ、ポリフィリン、フェロセン等の多くの化合物が既に知られており、フェロセン誘導体を用いた遺伝子検出の例が報告されている (Fan, C.; Plaxco, K.W.; Heeger, A. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 9134-9137)。更に、フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体等をインターカレート剤として使用したDNAチップ及びそれを用いる各種方法が提案されている (特開2003-3000公報、及び、特開2003-83968号公報)。

## 【0005】

一方で、通常6量体又は8量体であるヘアピン型のピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIPA) は、DNA配列を部位特異的に認識することができる合成有機分子のプロトタイプとして知られており、遺伝子調節としてのPIPA化合物の可能性も提案された (Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P.B. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7983-7988)。更に、元のPIPAにおける構造修飾によってその機能と特性を変更する試みが多く報告された。例えば、いくつかの研究グループは、蛍光色素 (Rucker, V.C.; Foister, S.; Melander, C.; Dervan, P.B. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 1195-1202)、又はアルキル化剤 (Wang, Y.-D.; Dziegielewski, J.; Wurtz, N.R.; Dzielawska, B.; Dervan, P.B.; Beerman, T. A. Nucleic Acids Res. 2003, 31, 1208-1215他) により元のPIPAの構造を修飾して、それを遺伝子検出ツールおよび潜在的な抗癌剤として応用することを提案した。

## 【0006】

そのような機能的な修飾とは別に、いくつかの研究グループは、DNA二重鎖に対するピロールとイミダゾールの親和性と配列特異性を改善するために、それらの構造を修飾して他の複素環指揮化合物へと変化させることを報告している。その中のあるものは、配列特異性の改善に成功したことが報告されている (Foister, S.; Marques, M. A.; Doss, R. M.; Dervan, P.B. Bioorganic

Med. Chem. Lett. 2003, 11, 4333-4340 他)。

【特許文献1】特開 2003-300公報

【特許文献2】特開 2003-83968号公報

【非特許文献1】Fan, C.; Plaxco, K.W.; Heeger, A. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 2003, 100, 9134-9137

【非特許文献2】Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P.B. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7983-7988

【非特許文献3】Rucker, V.C.; Foister, S.; Melander, C.; Dervan, P.B. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 1195-1202

【非特許文献4】Wang, Y.-D.; Dziegielewska, J.; Wurtz, N.R.; Dzielewska, B.; Dervan, P.B.; Beerman, T.A. Nucleic Acids Res. 2003, 31, 1208-1215

【非特許文献5】Foister, S.; Marques, M. A.; Doss, R.M.; Dervan, P.B. Bioorganic Med. Chem. Lett. 2003, 11, 4333-4340

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

これまでの電気化学的DNAチップに使用されてきたインターカレート剤は、二本鎖DNAのみならず一本鎖DNA鎖にも結合して二本鎖DNA以外に基づく電気的シグナルを発生させたり、又は、遊離のインターカレート剤が発生するノイズ電流が検出ノイズとなり、その結果、検出感度、即ち、電気化学シグナル対ノイズ比 (S/N) が高い、という問題点があった。

【0008】

更に、正統のヌクレオチドがG-T、A-G、及びG-Gのような相当に安定したミスマッチ塩基対を形成することはよく知られており、その結果、従来のインターカレート剤を使用する電気化学的検出方法では擬陽性シグナルが生じる可能性もある。

【0009】

そこで本発明者は、ピロール・イミダゾール・ポリアミド構造におけるリンカー領域を修飾することによって、二本鎖 (二重鎖) 核酸分子の塩基配列を特異的に認識することができる化合物を開発すべく研究の結果、ピロール・イミダゾール・ポリアミド構造におけるリンカー領域にフェロセン部分を有する化合物を合成することに成功し、上記問題点を解決することが出来た。

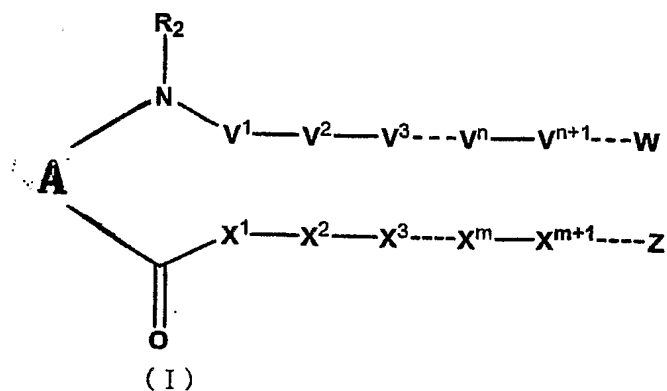
【課題を解決するための手段】

【0010】

即ち、本発明は第一の態様として、一般式 (I) で表されるフェロセン化合物：

【0011】

## 【化1】

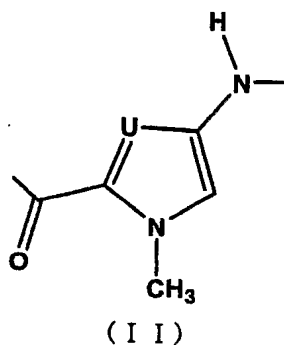


## 【0012】

(一般式 (I) 中、Aは二価のフェロセン含有リンカー又はフェロセン-1,1'-イルであり、R<sub>1</sub>は水素原子又はアルキルを示し、n及びmは任意の自然数を示し、V及びXは以下の一般式 (II) であり：

## 【0013】

## 【化2】

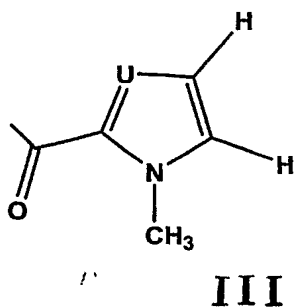


## 【0014】

Wは一般式 (III) であり：

## 【0015】

## 【化3】



## 【0016】

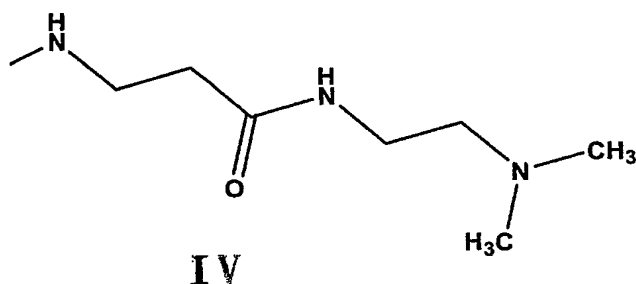
(一般式 (II) 及び一般式 (III) 中、Uは窒素原子、メチン、又はヒドロキシメチ

ンを示す) ; 及び

Z は一般式 (IV) 又は (V) であり :

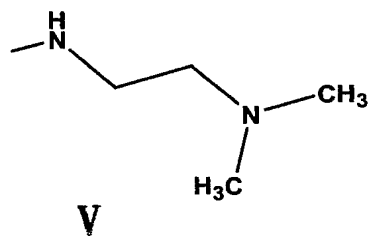
【0017】

【化4】



【0018】

【化5】



【0019】

且つ、一般式 (I) において V 1 のフェロセン含有リンカー又はフェロセン-1,1' -イル側の結合は  $(-CO-NR_2-)$  であり、それ以外の各 V n 及び X m の両端は  $(-CO-NH-)$  結合を形成する) に係る。

【0020】

上記一般式 (I) で示される本発明化合物は、二価のフェロセン含有リンカー及びそれに結合する 2 つのピロールイミダゾールポリアミド (PIPA) 領域から構成されるものである。

【0021】

従って、フェロセン含有リンカーはフェロセン基を含み、上記の機能を発揮できるような化合物 (原子団) である限り、どのような構造を有するものでも良い。

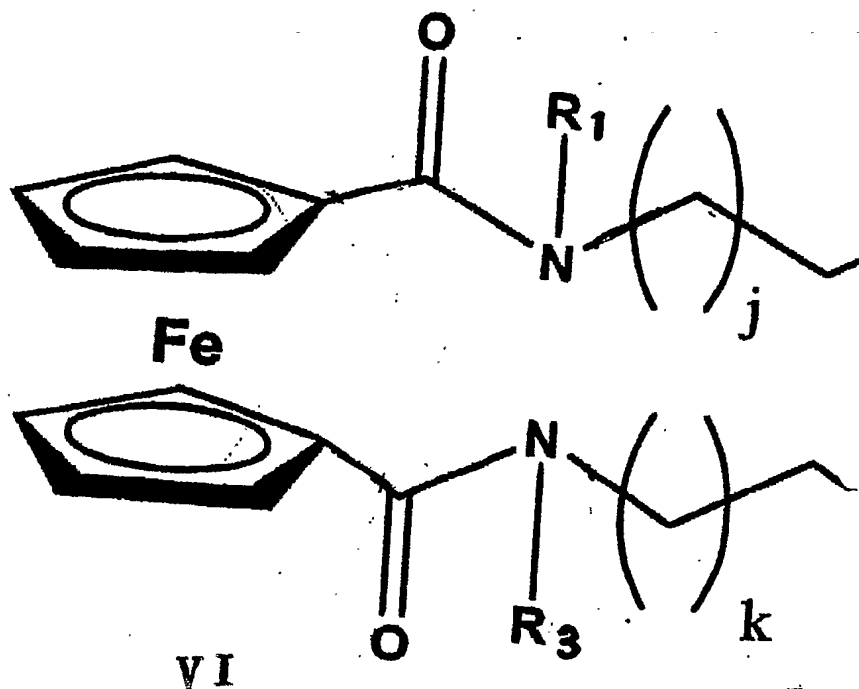
n 及び m は、好ましくは 3 ~ 20、より好ましくは 3 ~ 10 の範囲の自然数であり、更に、本発明化合物のフェロセン含有リンカーの両端に連なる原子団におけるイミダゾール誘導体及びピロール誘導体の合計数が最終的に等しくなるように、n は m より一つ少ない数であることが好ましい。

【0022】

二価のフェロセン含有リンカー (A) の好適例として、以下の一般式 (VI) 又は一般式 (VII) :

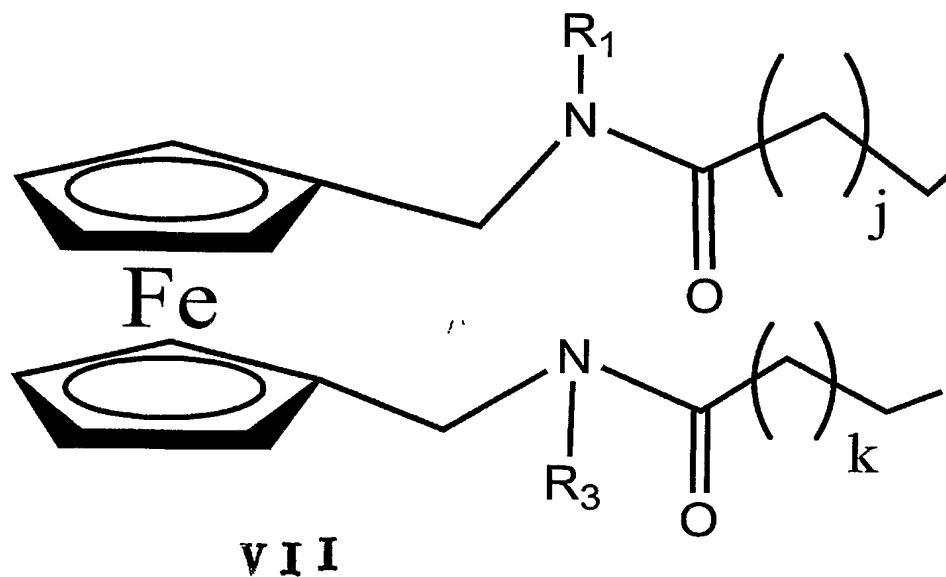
【0023】

【化6】



【0024】

【化7】



【0025】

(両式中、 $R_1$  及び  $R_3$  は水素原子又はアルキルを示し、 $j$  及び  $k$  は同一又は異なる 0 から 5 までの整数を示す) を挙げることが出来る。 $R_1$ 、 $R_2$  及び  $R_3$  は、例えば、メチル



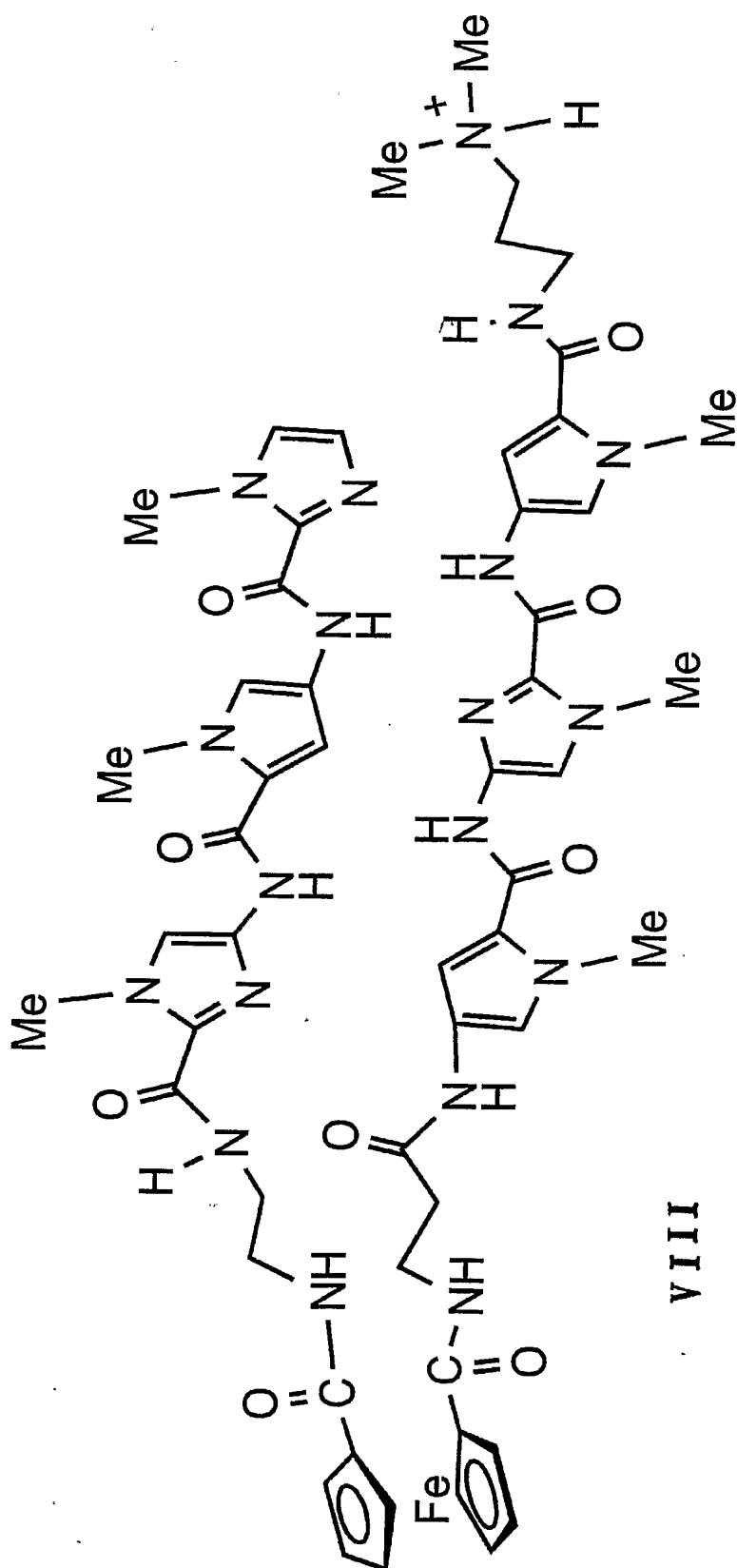
基のような一個ないし数個の炭素原子を有するアルキル基であることが好ましい。

【 0 0 2 6 】

上記化合物の一具体例として、下記構造式 (V I I I) 及び (I X) で表される化合物がある。

【 0 0 2 7 】

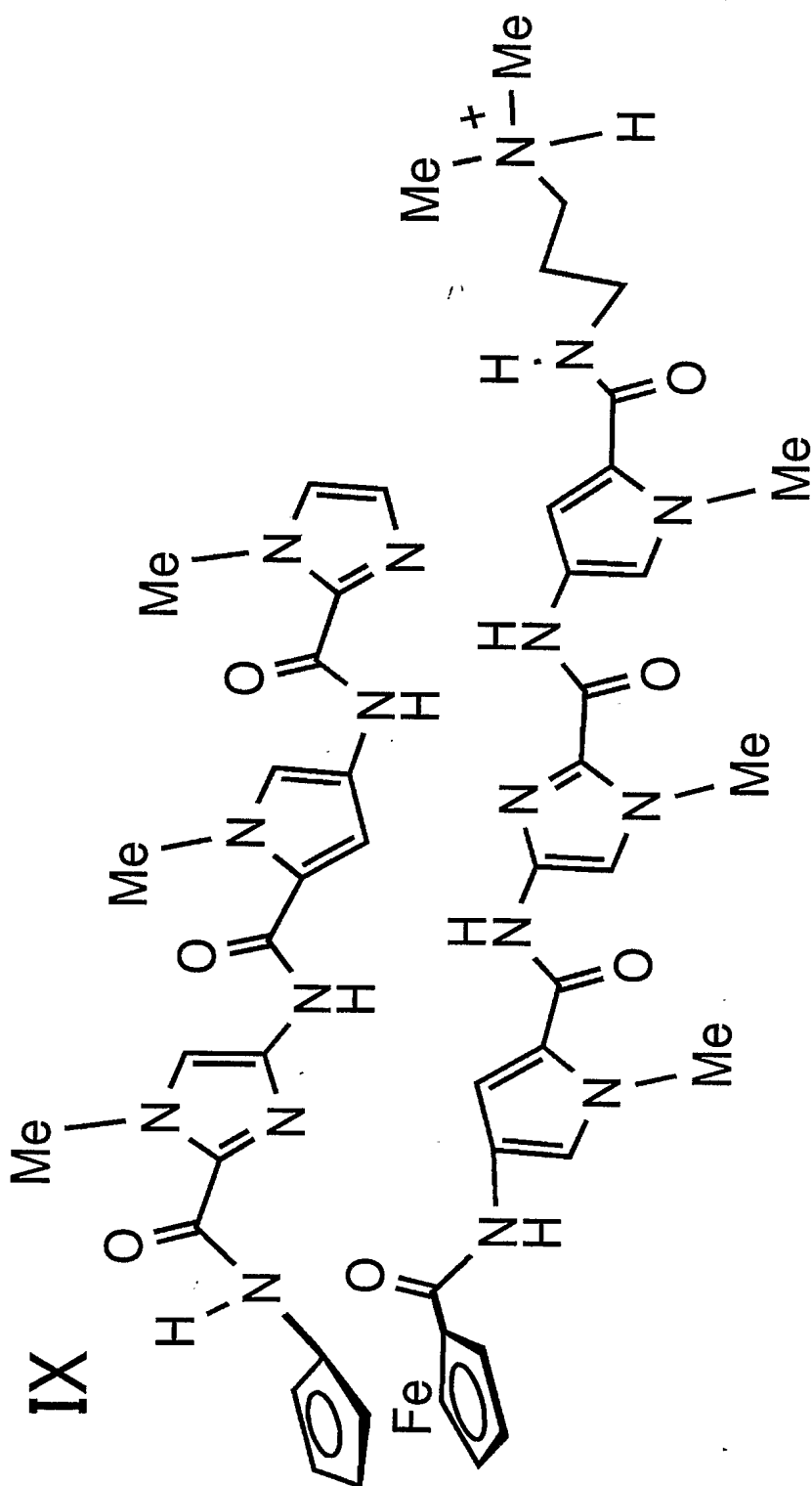
【化 8】



VIII

【0028】

【化9】



## 【0029】

本発明化合物は、例えば、以下の実施例に示される工程で合成することが出来る。尚、本明細書に具体的に記載していない各種反応条件等は当業者が容易に選択し採用することが出来る。

従って、本発明は第二の態様として、フェロセンジカルボン酸メチル又はアミノフェロセンカルボン酸メチルを出発物質とし、縮合反応を含む工程から成る、本発明化合物の製造方法に係る。その一具体例として、化10及び化11、又は化12に示された工程から成る製造方法を挙げることが出来る。

## 【0030】

本発明は第三の態様として、本発明のフェロセン化合物から成る二本鎖核酸分子の配列特異的検出用リガンドに係る。

## 【0031】

更に、本発明は第四の態様として、上記リガンドのような二本鎖核酸分子の配列特異的に結合することができる化合物を使用することを特徴とする二本鎖核酸分子の電気化学的検出方法、及び、電気化学的検出装置又は器具に係る。

## 【発明の効果】

## 【0032】

二重鎖核酸分子の塩基配列に特異的に結合する化合物、特に本発明の一般式(I)で示されるフェロセン化合物を利用することによって、電気化学的検出における電気化学シグナル対ノイズ比(S/N)を低くすることが出来、その結果、検出感度(精度)を大きく向上させることができ、超微量の核酸分子の定量的測定を可能とする。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0033】

本発明において、核酸はDNA及びRNAを意味し、従って、二本鎖核酸分子としては、DNA-DNA及びDNA-RNA等が含まれる。例えば、試料(ターゲット)の核酸分子としては、mRNA及び逆転写反応によって調製されたcDNA又はその断片等を用いることが出来る。一方、プローブとして使用する核酸分子としては、cDNA又はその断片、合成オリゴヌクレオチド等を使用することが出来る。これらは、電気化学的検出方法又は装置の種類等に応じて変るものであり、当業者には周知の技術的事項である。

## 【0034】

本発明の、電気化学的検出方法において、ハイブリダーゼーションの結果形成される検出対象である二本鎖核酸分子におけるG/C塩基対及びA/T(U)対に対して、一般式(I)中の対応する位置にあるV及びXの対が、夫々、イミダゾール誘導体/ピロール誘導体及びピロール誘導体/誘導体で構成されるように本発明化合物の構造を設計することによって、高い配列特異性を達成することが出来る。

## 【0035】

本発明の電気化学的検出方法の測定原理は核酸分子同士のハイブリダーゼーションであり、当業者に公知の任意の手段及び操作で実施することが出来る。例えば、固相におけるハイブリダイゼーションを使用する方法として、DNAマイクロアレイ(DNAチップ)を用いる方法を挙げることが出来る。このような電気化学的検出方法が行われる装置又は器具(例えば、電気化学チップ又はECAチップ)自体は当業者に公知であり、本発明においてもそのような装置又は器具を利用することが出来る。又、このような装置又は器具は当業者に周知の方法で容易に作成することが出来る。

## 【0036】

又、検出される電気信号としては、電流、電気導電度、電位、電気容量、インダクタンス、インピーダンス等の電氣的な信号が挙げられ、サイクリックボルタンメトリー(CV)、ディファレンシャルパルスボルタンメトリー(DPV)、リニアスweepボルタモグラフィーおよびポテンショスタット等の装置により測定される。

## 【0037】

本発明の二本鎖核酸分子の配列特異的検出用リガンドを用いる配列特異的な二本鎖核酸

分子の電気化学的検出方法は、一塩基多型（SNP）等の多型解析、塩基配列の決定、遺伝子変異解析、遺伝子発現モニタリング等の核酸分子のハイブリダイゼーションに基づく各種測定に利用することが出来る。

【実施例】

【0038】

以下、実施例に則して、本発明の一具体例を説明する。尚、当業者であれば、当該技術分野における技術常識及び本明細書の記載に基づき、本発明の技術的特徴を有するその他の各種態様を容易に想到することが可能であり、それらの各種態様も本発明の技術的範囲に属する。

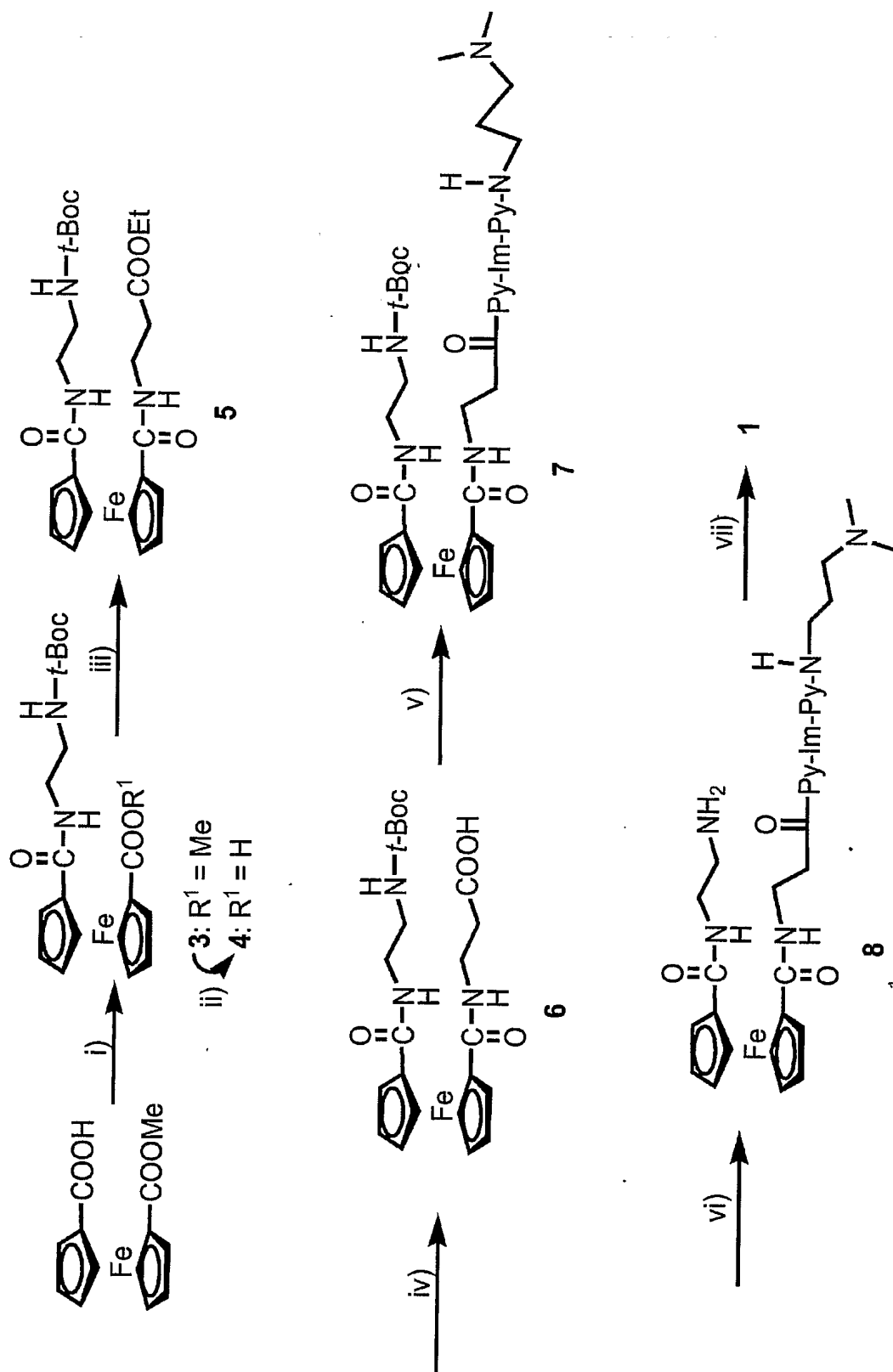
【0039】

実施例 1：構造式（VII I）の化合物に合成

本化合物は以下に示すスキームで合成された。

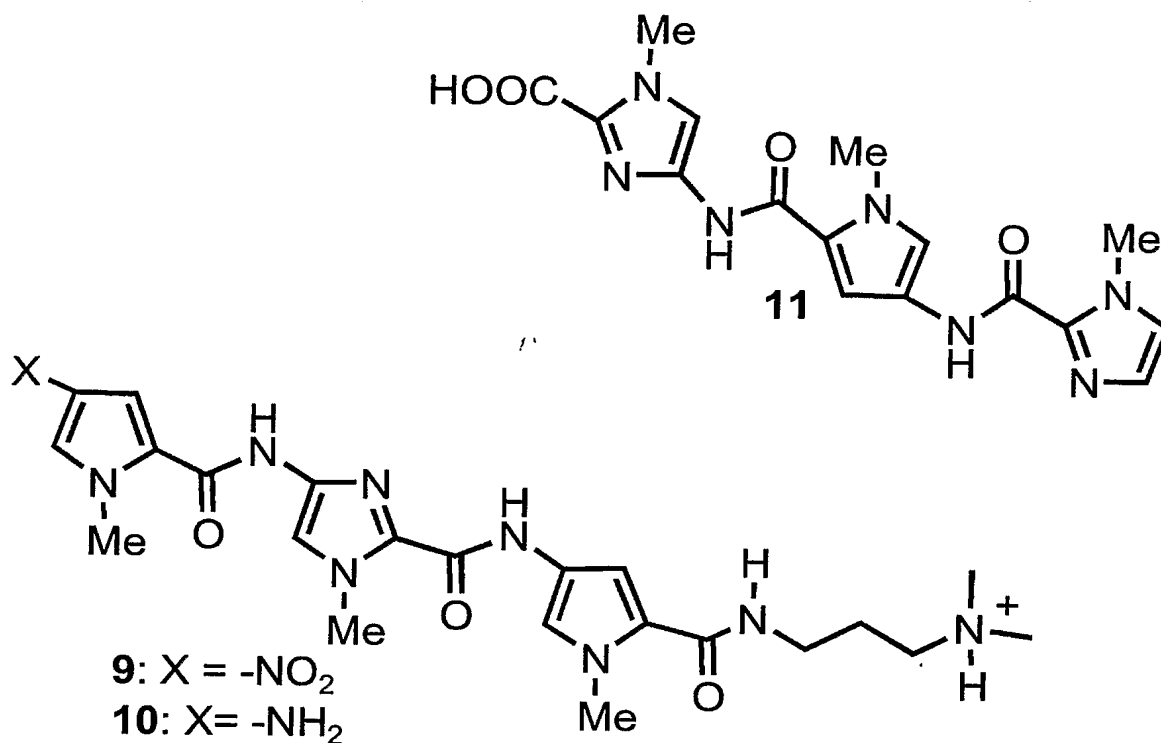
【0040】

【化10】



【0041】

【化11】



【0042】

尚、この化合物の構造は、出発原料の入手可能性、及び生成物と中間体の化学安定性の両方を考慮して設計された。PIPA領域の配列は、C型ウイルス肝炎によって感染した患者のインターフェロン耐性を決定した要因であり得るヒトゲノム中の一塩基変異をターゲットとするCGC/GCG配列に結合することを目指して設計された。

【0043】

フェロセンジカルボン酸メチル (2) は2-クロロ-1-メチルピリジニウムのヨウ化物 (CMI) (Bald, E.; Saigo, K.; Mukaiyama, T. Chem. Lett. 1975, 1163-1166) を用いて、N-*t*-ブトキシカルボニル-1,3-プロパンジアミンと縮合し、87%の収率を得た。得られた化合物 (3) はアルカリ性水溶液で処理してカルボン酸 (4) に変換した。これを、3-アミノプロピオン酸エチルと縮合してフェロセン結合ユニット (5) を得た (収率: 62%)。

【0044】

次に、ピロール・イミダゾール部分を導入するために、上記化合物 (5) のエチルエステルをアルカリ性水溶液で処理して除去し、化合物 (6) を得た (収率: 93%)。化合物 (6) の遊離カルボキシル基を、クロロ-1-メチルピリジニウムヨウ化物を用いる3-ニトロピロール誘導体 (9) の水素化によってその場で調製した3-アミノピロール誘導体 (10) と結合し、化合物 (7) を得た (収率: 62%)。この化合物 (7) を更にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の10% TFA処理で加水分解してアミン (8) を得た (収率: 71%)。

【0045】

ついで、化合物 8 (187.6mg, 0.477mmol) を塩化メチレン (4.77ml) に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン (0.162ml, 0.947mmol) と O-(ベンゾトリアゾール-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム

ヘキサフルオロフォスフェート (361.8mg, 0.954mmol) を縮合剤として加え (Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. Tetrahedron Letters 1978, 15, 1269-1272 他)、室温で 30 分間攪拌した。つづいて、別途合成した (Baird, E. E., Dervam, P. B. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 6414-6416) カルボン酸 (11) を塩化メチレン (4.8ml) に溶解させたもの (400mg, 0.477mmol) を加え、さらに 1 時間攪拌させた。水で洗浄し、有機層を回収後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し得た (349mg, 61%)。この化合物の構造は、 $^1\text{H}$ -NMR 及び  $^{13}\text{C}$ -NMR で確認した。

【0046】

$^1\text{H}$ -NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.59-1.65 (2H, m), 2.15 (6H, s), 2.26-2.28 (2H, t,  $J$  = 7.1 Hz), 2.56-2.59 (2H, t,  $J$  = 7.0 Hz), 3.18-3.22 (2H, m), 3.37-3.50 (6H, m), 3.81 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.99 (3H, s), 4.27-4.30 (4H, m), 4.73 (4H, s), 6.88 (1H, d,  $J$  = 1.7 Hz), 6.94 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz), 7.02 (1H, s), 7.16 (1H, d,  $J$  = 1.7 Hz), 7.19 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz), 7.26 (1H, d,  $J$  = 1.7 Hz), 7.35-7.36 (2H, m), 7.46 (1H, s), 7.49 (1H, s), 7.86-7.87 (1H, t,  $J$  = 5.6 Hz), 7.91-7.93 (1H, t,  $J$  = 5.5 Hz), 7.98-7.80 (1H, t,  $J$  = 5.5 Hz), 8.05-8.08 (1H, t,  $J$  = 5.7 Hz), 9.77 (1H, s), 9.88 (1H, s), 10.03 (1H, s), 10.06 (1H, s), 10.19 (1H, s)

【0047】

$^{13}\text{C}$ -NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  27.2, 35.1, 35.1, 35.3, 36.0, 36.1, 36.2, 36.4, 36.5, 37.4, 38.8, 39.0, 45.3, 57.3, 69.8, 71.7, 71.8, 77.9, 78.0, 79.3, 104.1, 104.8, 106.1, 114.6, 114.9, 118.0, 119.4, 119.6, 121.4, 122.1, 122.2, 122.3, 122.4, 123.5, 126.6, 127.2, 134.1, 134.4, 136.2, 138.9, 155.9, 156.3, 158.9, 158.9, 159.2, 161.2, 168.2, 168.6, 169.0 MS  $m/z$  calcd for C<sub>55</sub>H<sub>66</sub>FeN<sub>19</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>: 1192.46403, found 1192.37089.

【0048】

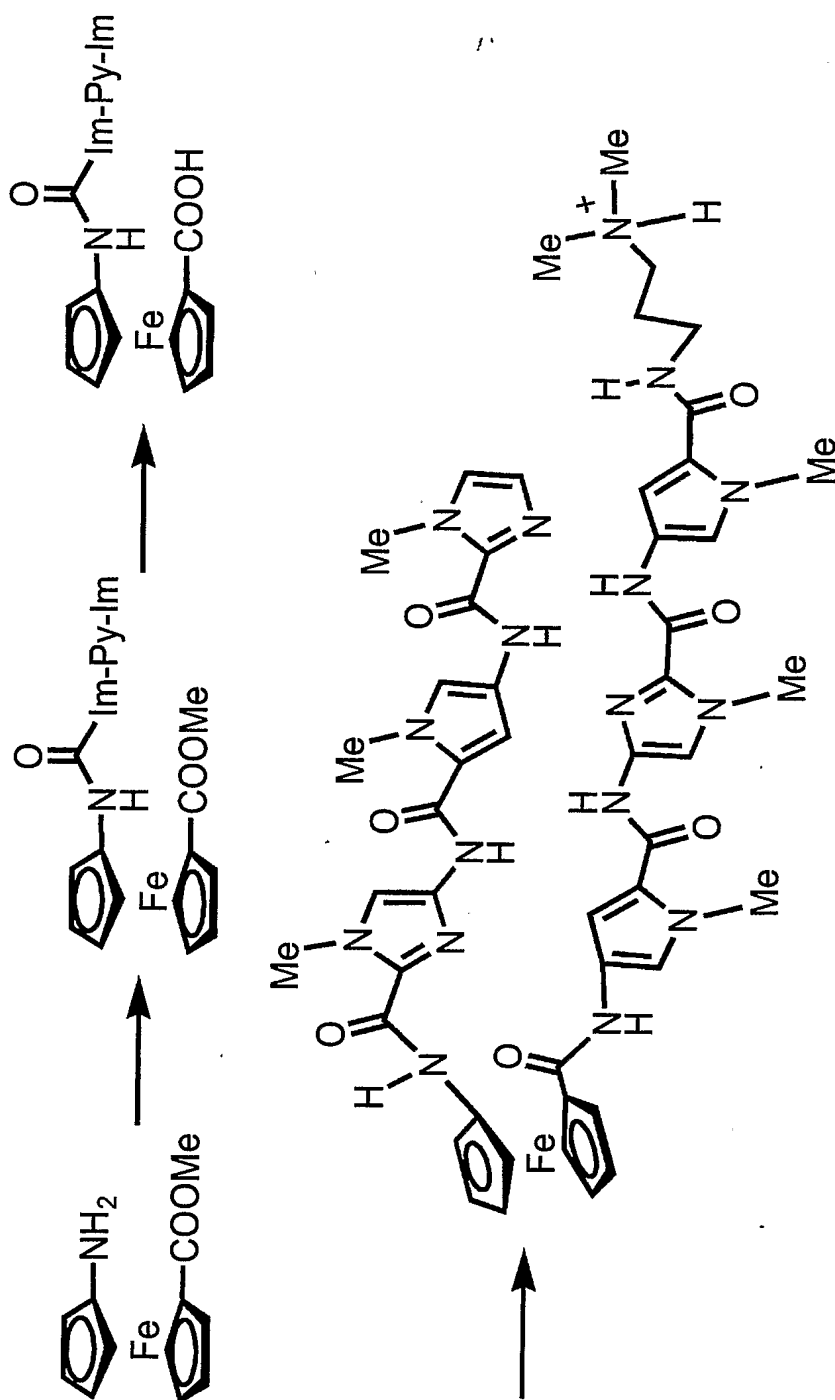
同様に、構造式 (IX) の化合物を以下に示すスキームで合成した。得られた化合物の構造は、 $^1\text{H}$ -NMR 及び  $^{13}\text{C}$ -NMR で確認した。

【0049】



【化12】

構造式IXの合成法



【0050】

 $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta$  1.57-1.63 (2H, m), 2.13 (6H, s), 2.22-2.25 (2H, t,  $J = 6.9$  Hz), 3.16-3.20 (2H, dd,  $J = 6.9$  Hz), 3.76 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.99 (3H, s), 4.04 (3H, t,  $J = 1.8$  Hz), 4.35 (3H, t,  $J = 1.8$  Hz), 4.85 (3H, t,  $J =$

2.0 Hz), 4.95(3H, t, J = 1.8 Hz), 6.88(1H, d, J = 1.7 Hz), 6.97(1H, d, J = 1.7 Hz), 7.03 (1H, d, J = 1.0 Hz), 7.07 (1H, d, J = 1.7 Hz), 7.19-7.20 (2H, m), 7.37 (1H, s), 7.38 (1H, s), 7.49 (1H, s), 7.52 (1H, s), 8.07-8.10(1H, t, J = 5.6 Hz), 9.13(1H, s), 9.51 (1H, s), 9.90 (1H, s), 10.16 (1H, s), 10.25 (1H, s), 10.35 (1H, s)

【0051】

$^{13}\text{C}$ -NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$  27.3, 33.6, 35.1, 35.3, 36.2, 36.4, 36.5, 37.4, 45.4, 57.4, 61.9, 65.7, 69.3, 71.1, 78.3, 79.4, 96.1, 104.1, 105.4, 106.1, 114.9, 115.0, 118.0, 119.7, 119.8, 121.3, 121.7, 121.8, 122.3, 122.4, 123.5, 126.6, 127.2, 133.9, 134.3, 136.2, 136.3, 138.9, 155.9, 156.3, 156.9, 158.9, 158.9, 161.2, 165.7

MS m/z calcd for C<sub>49</sub>H<sub>56</sub>FeN<sub>17</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>: 1050.38980, found 1050.40297.

【0052】

実施例 2: 構造式 (V I I I) の化合物のリガンドとしての特性

上記化合物の二重ヘリカル DNA に対するリガンドとして有用性を確認する目的で、ターゲット DNA (TTTCTGCGCCGGAG/CTCCGGCCGAGAAA: T<sub>m</sub> = 67.1°C) への結合を CD スペクトルによって検査した。その結果を図 1 に示した。図 1 は、本化合物の 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 及び 1.4 当量による上記 DNA の滴定の CD プロフィールである。副溝結合との相互作用によって、300-360 nm における楕円偏光が誘起される (Pilch,

D.S.; Poklar, N.; Baird, E.E.; Dervan, P.B.; Breslauer, K.J. Biochemistry, 2002, 38, 2143-2151) ことは良く知られている。従って、ターゲット DNA の 5.0  $\mu$ M 溶液を添加することによって、濃度依存性の正のコットン効果の増加が見られ、292 nm に等吸収点があった。

【0053】

次に、サイクリックボルタンメトリー (CV) の使用によって上記化合物の電気化学的特性を検討した。その結果を図 2 に示す。この結果から、本化合物がフェロセン部分の酸化および還元起因した酸化還元反応の活性を有していることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明は、創薬、臨床検査、医薬品のスクリーニング、化学物質の安全性検査、食品検査、検疫、法医学的検査、醸造、農業、林業、水産業、及び、畜産等の幅広い産業分野で適用することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0055】

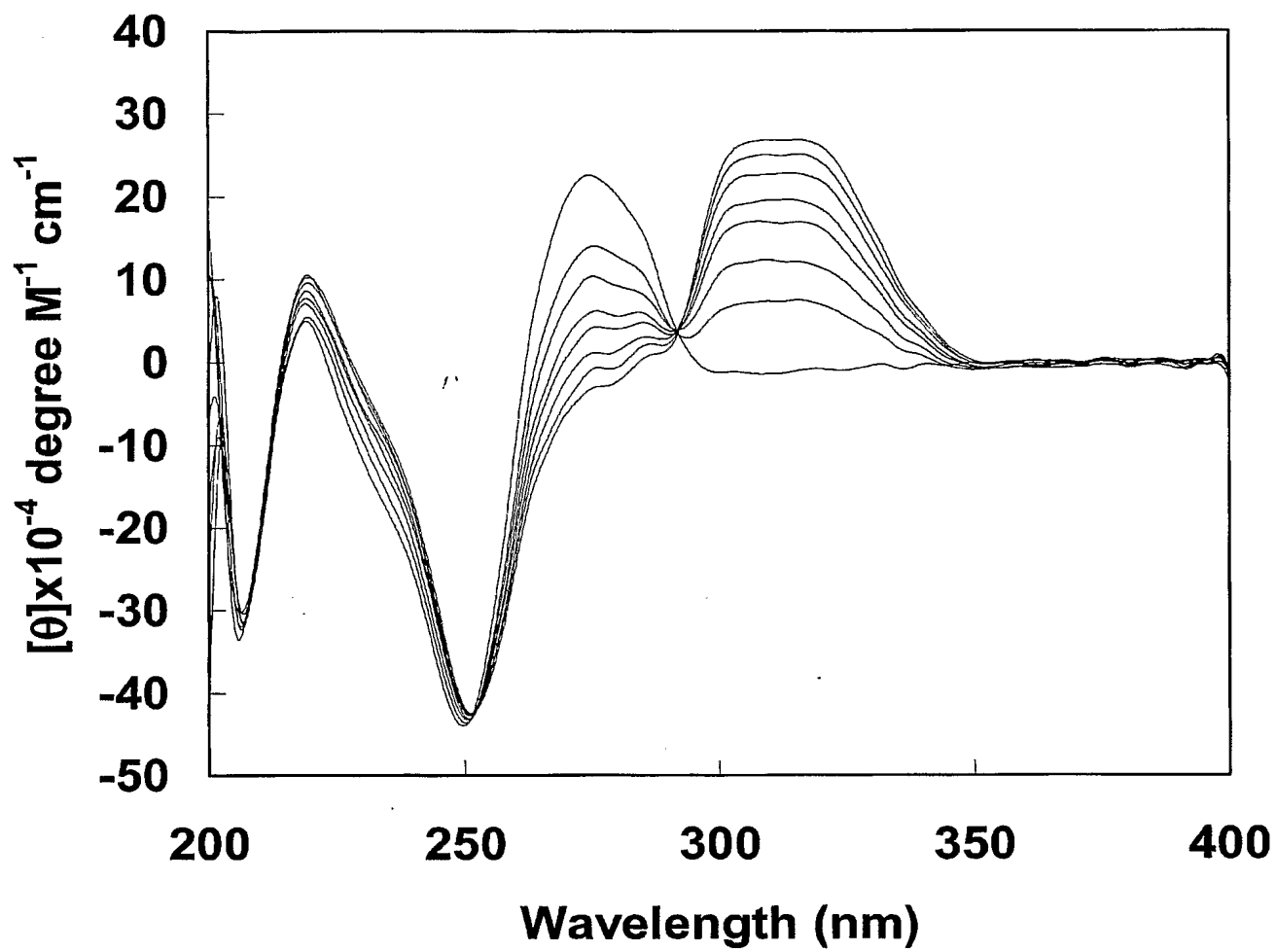
【図 1】 本化合物による上記 DNA の滴定の CD プロフィールである。反応は、10mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM CaCl<sub>2</sub> 含有 10mM カコジル酸ナトリウム (pH 6.9) にて行われた。

。

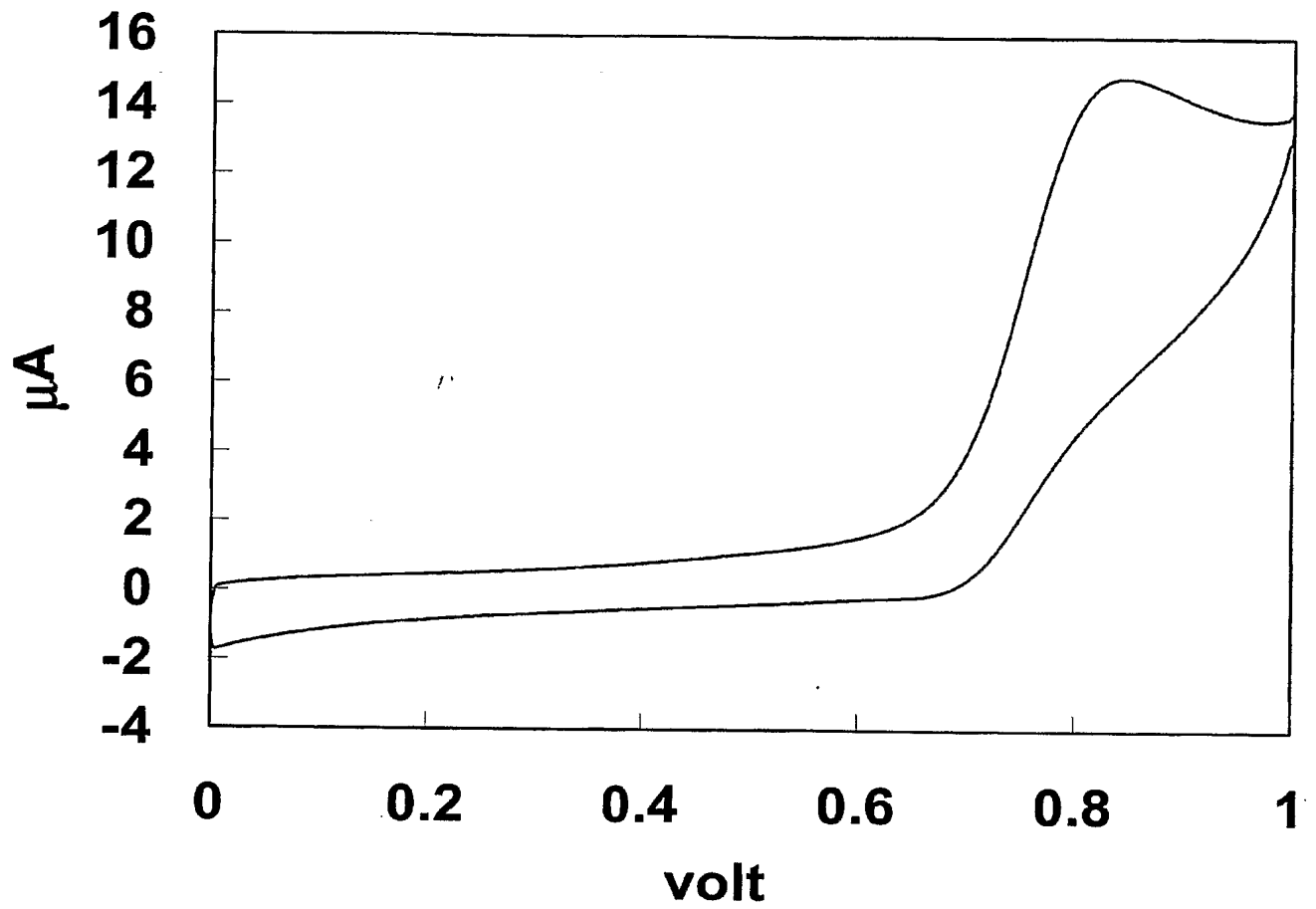
【図 2】 サイクリックボルタンメトリー (CV) による試験で得られた本発明化合物の電気化学的特性を示した。試験は、本発明化合物 (5 mM) を使用して、0.2 M NaCl O<sub>4</sub> 含有 N,N-ジメチルホルムアミド中で測定した。レファレンス電極: AgCl<sub>2</sub>; カウンター電極: Pt; 作動電極: Pt。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



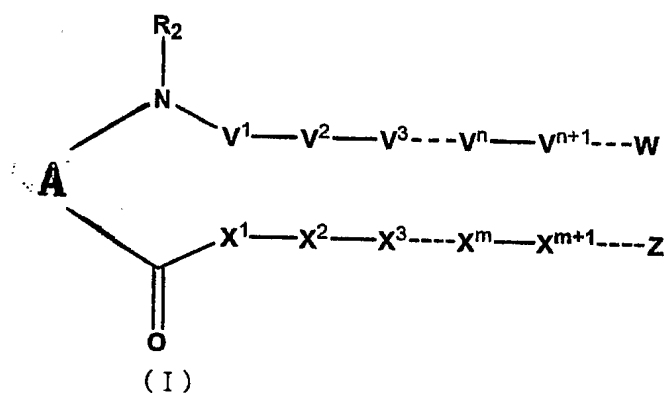
【書類名】要約書

【要約】

【課題】電気化学的検出における電気化学シグナル対ノイズ比（S/N）を低くすることが出来、その結果、検出感度（精度）を大きく向上させることができ、超微量の核酸分子の定量的測定を可能とする、二重鎖核酸分子の塩基配列に特異的に結合する化合物を提供すること。

【解決手段】一般式（I）で表されるフェロセン化合物：

【化 1】



【選択図】

図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 4 7 6 0 5
受付番号	5 0 4 0 0 2 9 2 9 1 6
書類名	特許願
担当官	岩谷 貴志郎 7 7 4 6
作成日	平成 1 7 年 2 月 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成 1 6 年 2 月 2 4 日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 4 月 1 日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 独立行政法人科学技術振興機構